

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. August 2001 (09.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/56590 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 38/08**,
38/17, 38/55, G01N 33/566, A61P 9/00, 9/06, 9/12

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01002

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Januar 2001 (31.01.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 04 858.7 3. Februar 2000 (03.02.2000) DE

(71) Anmelder: SCHERING AG [DE/DE]; Müllerstrasse 178,
13353 Berlin (DE).

(72) Erfinder: KNÖLL, Ralph; c/o Helga Schäfer, Guten-
bergstrasse 4, 61169 Friedberg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: UTILIZATION OF PROTEIN KINASE INHIBITOR ALPHA

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON PROTEINKINASE-INHIBITOR-ALPHA

(57) Abstract: The invention concerns the utilization of PKI alpha and/or the derivatives thereof to lower blood pressure, as beta antagonists and for the production of a medicament for the prevention and/or treatment of diseases in which a beta antagonist can be used. The invention also concerns the utilization of an inhibitor of PKI alpha or a derivative thereof to lower blood pressure, as beta agonist and for the production of a medicament for the treatment and/or prevention of diseases in which a beta agonist can be used.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft in einem Aspekt die Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivate zur Blutdrucksenkung, als beta-Antagonisten und zur Herstellung eines Medikaments für die Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, bei denen ein beta-Antagonist verwendet werden kann. In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines Inhibitors von PKI-alpha oder eines Derivates davon zur Blutdruckerhöhung, als beta-Agonist und zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Agonist verwendet werden kann.

WO 01/56590 A2

Verwendung von Proteinkinase-Inhibitor-alpha

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Proteinkinase-Inhibitor-alpha (PKI-alpha), die Verwendung von Inhibitoren von Proteinkinase-Inhibitor-alpha und Verfahren zum Screenen auf beta-Agonisten und beta-Antagonisten.

Im Jahre 1975 wurde erstmals das Phänomen des „myocardial stunning“ beschrieben. Darunter versteht man die Eigenschaft des Myokards, nach kurzzeitiger Ischämie infolge koronarer Okklusionen eine lang anhaltende, reversible myokardiale Dysfunktion zu zeigen, d.h. der Herzmuskel zeigt nicht die erwartete Kontraktilität. Dieser reversible Zustand hält für mehrere Stunden an und widersprach der bis dahin in der Fachwelt verbreiteten Auffassung, daß ein ischämischer Zustand von mehr als 45 Minuten unwiderruflich mit einem Absterben der Myozyten einhergeht.

Als Pathogenitätsmechanismus für das „myocardial stunning“ wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen, Kalziumüberladung, Dysfunktion des sarkoplasmatischen Reticulums und Troponin-Proteolyse diskutiert (Bolli; Mechanism of myocardial „stunning“. Circulation 1990: 723-38; und Wijns, Vatner, Camici. Hibernating myocardium. New England Journal of medicine. 1998. 173 – 81). Jeder dieser Mechanismen ist jedoch nicht geeignet, das Phänomen vollständig zu beschreiben (Duncker et al.; Myocardial stunning remainig questions. Cardiovasc Res 1998; 38: 549 – 558).

Die im Herz vorhandene Proteinkinase A (fortan auch als PKA bezeichnet), die die myokardiale Kontraktilität mittels Phospholamban und Phosphorylierung von Troponin I reguliert, wird durch Rezeptoren gesteuert, die an die Adenylatcyclase gekoppelt sind, die wiederum durch Katecholamine reguliert wird. Die Enzymaktivität wird sowohl durch Proteinkinase-Inhibitoren (hierin im folgenden als PKI bezeichnet) als auch

durch cAMP reguliert. Im Herz finden sich zwei Formen von Proteinkinase-Inhibitoren: Die alpha- und die beta-Form (PKI-alpha und PKI-beta). Beide wirken als kompetitive Inhibitoren, indem die C α - und C β -Untereinheiten der aktiven Proteinkinase A blockiert werden. Dabei ist die α -Form sechsmal
5 wirksamer als die β -Form.

Ein im Stand der Technik bekannter Proteinkinase-Inhibitor ist der Proteinkinase-Inhibitor alpha (hierin auch als PKI-alpha bezeichnet). PKI-alpha weist eine Länge von 76 Aminosäure auf, wobei der für die inhibitorische Wirkung wesentliche Teil der Primärsequenz auf den Bereich
10 der Aminosäuren 14 bis 22 beschränkt zu sein scheint. Diese Sequenz ist beim Menschen, Schwein, Hühnchen, Ratte und Maus zu 100 % identisch. Auf der Eben der mRNA zeigt das 5'-Ende der gesamten mRNA vom Schwein eine Sequenzhomologie von etwa 90 % verglichen mit derjenigen des Genoms vom Menschen, der Maus, der Ratte und dem Hühnchen. Ein
15 rekombinanter PKI-alpha umfassend nur die Aminosäuren 14 bis 22 der vollständigen PKI-alpha-Aminosäuresequenz ist zellpermeabel und von Calbiochem erhältlich (Produktnummer # 476485).

Die für PKI-alpha codierende cDNA vom Schwein weist an seinem 5'-Ende einen zweiten offenen Leserahmen, der für ein Polypeptid mit 9 Aminosäuren
20 codiert, und mehrere verschiedene poly(A)-Signalsequenzen an seinem 3'-Ende auf (GenBank #bankit256111AF132737)

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verwendungen für PKI-alpha und für einen Inhibitor von PKI-alpha bereitzustellen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung von PKI-alpha
25 alpha und/oder dessen Derivaten zur Blutdrucksenkung.

In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch die Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivaten als beta-Antagonist.

In einem noch weiteren Aspekt der Erfindung wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivate zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, bei denen ein beta-Antagonist verwendet werden kann.

- 5 Bei den erfindungsgemäßen Verwendung kann vorgesehen sein, daß der PKI-alpha eine in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.

- In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen wird der PKI-alpha codiert von einer Nukleinsäure, die der codierenden Sequenz der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz oder einer sich daraus infolge der
10 Degeneriertheit des genetischen Codes ergebenden oder einer daran hybridisierenden Nukleinsäure entspricht.

Bei den erfindungsgemäßen Verwendungen kann auch vorgesehen sein, daß der PKI-alpha in einer verkürzten Form verwendet wird.

- Bei einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen
15 Verwendungen kann vorgesehen sein, daß der PKI-alpha die Aminosäuren 14 bis 22 der PKI-alpha-Sequenz, insbesondere der Sequenz von PKI-alpha nach SEQ ID No.1 oder SEQ ID No. 2 umfaßt.

- In besonders bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, daß der PKI-alpha oder dessen Derivat zur
20 Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten verwendet, wird, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Herzrhythmusstörungen, hyperkinetisches Herzsyndrom, Angina pectoris, Myokardinfarkt, akuter Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonus, essentielle und renale Hypertonie, Pfortaderhochdruck, Blutungen aus Oesophagusvarizen,
25 Phäochromozytom, Überdosierung von beta-Sympathomimetika und Cholinrezeptoren-Blockern, Glaucoma simplex, Hyperthyreose, Thyreotoxikose, Migräne, essentieller Tremor, Erregungstremor und Alkohol-Entzugssyndrom umfaßt.

In weiteren besonders bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, daß der PKI-alpha oder dessen Derivat zur Postinfarkt-Medikation, Prophylaxe der Reinfarktes und/oder als Beruhigungsmittel verwendet wird.

- 5 Erfindungsgemäß wird die Aufgabe auch dadurch gelöst, durch die Verwendung eines Inhibitors von PKI-alpha oder eines Derivates davon zur Blutdruckerhöhung.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines Inhibitors des PKI-alpha oder eines Derivates davon als beta-Agonist.

- 10 In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines Inhibitors des PKI-alpha oder eines Derivates davon zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Agonist verwendet werden kann.

- 15 In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen ist dabei vorgesehen, daß der Inhibitor die Transkription des PKI-alpha beeinflusst.

Bei den erfindungsgemäßen Verwendung kann weiter vorgesehen sein, daß der PKI-alpha ein PKI-alpha ist, wie er hierin beschrieben ist.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, daß der Inhibitor des PKI-alpha eine Aminosäuresequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Sequenzen mit der SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4 umfaßt.

- 25 Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verwendungen ist vorgesehen, daß der Inhibitor des PKI-alpha zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten verwendet wird, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, chronische und akute Herzinsuffizienz und Hypotonie umfaßt.

In einem weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Screenen auf Mittel zur Blutdrucksenkung, beta-Antagonisten und/oder Mitteln zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Antagonist verwendet werden kann, wobei
5 vorgesehen ist, daß

- eine Mischung aus einem beta-Rezeptor, einem beta-Agonisten des beta-Rezeptors und einem Kandidaten-beta-Antagonisten bereitgestellt wird, und
- bestimmt wird, inwieweit sich durch den Kandidaten-beta-Antagonisten das Bindungsverhalten des beta-Agonisten an den
10 beta-Rezeptor ändert.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß die unter dem Einfluß des Kandidaten-beta-Antagonisten beobachtete Änderung des Bindungsverhaltens des beta-Agonisten an den beta-Rezeptor
15 verglichen wird mit der unter dem Einfluß des beta-Antagonisten, wie er hierin beschrieben ist, beobachteten Änderung des Bindungsverhaltens des beta-Agonisten an den beta-Rezeptor.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß der beta-Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe, die beta1-
20 und beta2-Rezeptoren umfaßt.

In einer noch weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß der beta-Agonist ein Sympathomimetikum ist, insbesondere ein solches, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dobutamin umfaßt.

25 Schließlich kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen sein, daß der beta-Agonist ein beta-Agonist ist, wie er hierin beschrieben ist.

In einem noch weiteren Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zum Screenen auf Mittel zur Blutdrucksenkung, beta-Agonisten und/oder Mittel zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Agonist verwendet werden kann, wobei

- 5 - ein Transkriptionssystem für einen beta-Antagonisten bereitgestellt wird,
- ein Kandidaten-beta-Agonist dem Transkriptionssystem zugesetzt wird und
- bestimmt wird, inwieweit sich durch den beta-Agonisten die
- 10 Transkription für den beta-Antagonisten ändert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß die unter dem Einfluß des Kandidaten-beta-Agonisten beobachtete Änderung der Transkription des beta-Antagonisten verglichen wird mit der unter dem Einfluß des beta-Agonisten, wie er hierin beschrieben

15 ist, beobachteten Änderung der Transkription des beta-Antagonisten.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens ist vorgesehen, daß der beta-Antagonist ein solcher ist, wie er hierin beschrieben ist.

In einer noch weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß der beta-Antagonist erhältlich ist nach einem der

20 erfindungsgemäßen Verfahren.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß PKI-alpha eine negative inotrope, d.h. eine die Myocardfunktion verschlechternde Wirkung aufweist. Diese Wirkung kommt über eine Hemmung der Proteinkinase A zustande, die für die Phosphorylierung von

Phospholamban und Troponin verantwortlich ist (sog. beta-adrenerge Signaltransduktion). Infolge der negativen inotropen Wirkung von PKI-alpha wird umgekehrt durch Hemmung des PKI-alpha die Myokardfunktion, insbesondere bei Herzinsuffizienz, verbessert.

- 5 Die erfindungsgemäßen Verwendungen beruhen alle auf der vorstehend beschriebenen Erkenntnis, daß PKI-alpha eine konzentrationsabhängige, negative inotrope Wirkung aufweist, und an der beta-adrenergen Signaltransduktion beteiligt ist. Daraus ergibt sich in einem Aspekt, daß PKI-alpha zur Blutdrucksenkung bzw. zur Herstellung eines Medikamentes hierzu
10 verwendet werden kann. In einem anderen Aspekt ergibt sich daraus, daß PKI-alpha als beta-Antagonist verwendet werden kann. Letzteres liegt darin begründet, daß die Wirkung der Katecholamine bindenden beta-Rezeptoren an der die Kontraktilität regulierenden Proteinkinase A durch die Proteinkinase-Inhibitoren gegengesteuert werden kann, diese somit eine beta-
15 antagonistische Wirkung zeigen.

- Infolge der beta-antagonistischen Wirkung des PKI-alpha eignet sich dieser auch zur Herstellung von Medikamenten für die Behandlung von Krankheiten, bei denen allgemein ein beta-Antagonist verwendet wird. Mit anderen Worten: Aufgrund der beta-adrenergen Wirkung von PKI-alpha kann dieser bzw.
20 Derivate hiervon an der Stelle von bzw. in Ergänzung zu dem bzw. den bisher verwendeten beta-Antagonisten in Medikamenten verwendet werden. Grundsätzlich bestehen dabei keinerlei Einschränkungen, so daß mit PKI-alpha bzw. mit einem diesen enthaltenden Medikament nun ein Ersatz für ein jegliches, einen beta-Antagonisten als pharmazeutischen Wirkstoff
25 enthaltendes Medikament bereitgestellt wird.

- Da der PKI-alpha nicht nur im Muskelgewebe, sondern auch in Nervengewebe, insbesondere im Gehirn, exprimiert wird, sind auch insbesondere neurophysiologische Indikationsfelder für den PKI-alpha und Inhibitoren desselben im Rahmen der vorliegenden Erfindung. Beispielfhaft sei
30 hier auf Migräne verwiesen, zu deren Therapie beta-Antagonisten verwendet

werden, die erfindungsgemäß durch PKI-alpha ersetzt werden können. Es ergibt sich für den Fachmann, daß ein jegliches Gewebe, das PKI-alpha exprimiert und pathologische oder geänderte Zustände ausbildet, erfindungsgemäß mit PKI-alpha und Inhibitoren desselben therapeutisch oder präventiv behandelt werden kann.

Mit den erfindungsgemäßen Verwendungen ergeben sich eine Reihe von Vorteilen. So wird mit der Verwendung des PKI-alpha und eines Inhibitors desselben die Gruppe der pharmazeutisch wirksamen Verbindungen erheblich erweitert, insbesondere insoweit, als daß eine vollständig neue Klasse von Verbindungen in diesen therapeutisch sehr wichtigen Indikationsgebiet eingeführt wird. Darüber hinaus ist die Verwendung von PKI-alpha und Inhibitoren davon auch insoweit von Vorteil, als daß sie sehr früh in der Kaskade der beta-adrenergen Signaltransduktion ansetzen und somit nicht der unerwünschten und mit vielfältigen Nachteilen verbundenen Down-Regulation der beta-Rezeptoren unterliegen. Diese Vorteile werden im folgenden anhand der Herzinsuffizienz weiter erläutert werden.

Die Herzinsuffizienz gehört in den westlichen Industriestaaten durch seine hohe Prävalenz (1-1,5 %) und Morbidität der erwachsenen Bevölkerung sowie seine entsprechend hohen Kosten zu den wichtigsten Erkrankungen (Sharpe N. et al.; Lancet 352 (suppl I), 3 – 7 (1998)). Zu ihrer Therapie werden eine Reihe von Medikamenten eingesetzt, von denen jedoch nur wenige wirklich, d. h. auch auf viele Jahre hinaus, effektiv sind. Hierzu zählen vor allem β -blockierende Substanzen und ACE-Hemmer (Cleland, J; Lancet 352 (suppl I), 1 – 2 (1998)). Im Gegensatz hierzu sind die weiterhin gebräuchlichen Kalziumantagonisten (z.B. Adalat- Nifedipin) in Verruf geraten (Prescrire Int 7(35), 90 – 91 (1998); und Ishibashi, Y. et al.; Clin Exp Pharmacol Physiol 26(5 – 6), 404-10 (1999)). Vor allem ihre akuten Effekte, die die Mortalität der behandelten Patienten zu erhöhen scheinen, mahnen zur Vorsicht bei Verwendung dieser Medikamente. Im Gegensatz hierzu scheinen β -Blocker erhebliche Vorteile, insbesondere bezüglich der Mortalität, für die betroffenen Patienten zu haben. Leider wirken diese Medikamente über die β_1 - und β_2 -

- Rezeptoren, die der sogenannten down-Regulation unterliegen und deshalb ihren Wirkort verfehlen können (Massie, B.; Lancet 352 (suppl I), 29 – 33 (1998). Es werden deshalb zunehmend Substanzklassen gesucht, die ihren Wirkort weiter oberhalb der β -adrenergen Signaltransduktionskaskade haben.
- 5 Durch die Hemmung der Proteinkinase A, vor allem durch intracoronare Applikation, scheint der PKI-alpha, insbesondere die Aminosäuren 14-22 davon, in die gewünschte Substanzklasse zu gehören.

- In diesem Zusammenhang besonders interessant erscheint daher ein Inhibitor
- 10 des PKI-alpha, insbesondere der vom zweiten offenen Leserahmen des PKI-alpha codierte Inhibitor des PKI-alpha (PKI-alpha-I). Es können somit, wie jeweils gewünscht, sowohl die beta-antagonistischen als auch die beta-agonistischen Wirkungen durch die Verwendung von PKI-alpha bzw. eines Inhibitors desselben zur Geltung gebracht werden.

15

- Die Aminosäuresequenz von PKI-alpha ist in SEQ ID No.1 zusammen mit der sie codierenden Nukleinsäuresequenz dargestellt und als Aminosäuresequenz als solches in SEQ ID No. 2. Es ergibt sich für den Fachmann, daß der PKI-alpha nicht auf denjenigen PKI-alpha beschränkt ist,
- 20 der die als Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 2 dargestellten Sequenzen aufweist. Vielmehr wird unter einem PKI-alpha hierin ein jeglicher die Aktivität der Proteinkinase A beeinflussender Proteinkinase-Inhibitor verstanden. Insoweit wird dem Begriff des Proteinkinase-Inhibitors hierin eine funktionelle Definition zugrunde gelegt.

- 25 Infolge der hierin verwendeten funktionellen Definition des Begriffes des Proteinkinase-Inhibitors ist auch die in SEQ ID No.1 dargestellt Nukleinsäuresequenz lediglich ein Beispiel für eine einen Proteinkinase-Inhibitor codierende Sequenz. Andere Sequenzen ergeben sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes.

- 30 Der Proteinkinase-Inhibitor-alpha weist in seiner nativen Form eine Länge von 76 Aminosäuren auf. Tatsächlich erstreckt sich der für die inhibitorische

- Wirkung relevante Bereich der Primärsequenz von Aminosäure 14 bis 22, so daß auch verkürzte („trunkierte“) Formen von Proteinkinase-Inhibitoren, insbesondere von PKI-alpha, erfindungsgemäß verwendet werden können. Von besonderem Vorteil erscheint dabei die Verwendung von PKI-alpha, dessen Sequenz auf die Aminosäuren 14 bis 22 der vollständigen Aminosäuresequenz beschränkt ist. Dieser verkürzte PKI-alpha ist membrangängig oder membranpermeabel, d.h. er kann über eine cytoplasmatische Membran in den intrazellulären Raum gelangen und dort die intrazellulären Kompartimente, insbesondere das sarkoplasmatische Retikulum und die Proteinkinase A, erreichen. Somit kann PKI-alpha und insbesondere eine verkürzte Form und ganz besonders die die Aminosäuren 14 bis 22 der vollständigen Primärsequenz des PKI-alpha, wie dargestellt in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No.2, umfassende verkürzte Form intrakoronar, intraperitoneal oder auch intravenös gegeben werden.
- 15 Dabei ist es im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmannes, daß PKI-alpha ebenso wie dessen Inhibitor in modifizierter Form vorliegen kann. Eine derartige Modifizierung kann bspw. im Zusammenhang mit den Erfordernissen der Galenik erfolgen. Andere Modifizierungen können die pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften betreffen.
- 20 Formulierungen, die PKI-alpha oder einen Inhibitor desselben umfassen, können die üblichen galenischen Hilfsstoffe und Bestandteile umfassen, wie pharmazeutisch akzeptable Träger und Puffer.
- Beta-Blocker, d.h. beta-Antagonisten, und damit erfindungsgemäß PKI-alpha und dessen Derivate finden bspw. Anwendungen als bzw. zur bzw. bei
- 25 1. Antiarrhythmika (Herzrhythmusstörungen)
 2. Hyperkinetisches Herzsyndrom
 3. Antianginöse Medikamente (Angina pectoris)

4. Verbesserung der Prognose bei Patienten mit Myokardinfarkt (Postinfarkt-Medikation), akuter Myokardinfarkt und Prophylaxe des Reinfarktes
5. Therapie bei Herzinsuffizienz
- 5 6. Antihypertensiva (arterieller Hypertonus, essentielle und renale Hypertonie)
7. Pfortaderhochdruck, Blutungen aus Oesophagusvarizen
8. Phäochromozytom (erst nach vorausgegangener Alpha-Blockade anwendbar)
- 10 9. Überdosierung von β -Sympathomimetika und m cholinozeptorenzeptoren -Blockern
10. Glaukom am Auge (Glaucoma simplex)
11. Hyperthyreose und Thyreotoxikose
12. Therapie zentralnervöser Erkrankungen wie bspw. Migräne und als
15 Beruhigungsmittel (zentral dämpfender Effekt) (essentieller Tremor, Erregungstremor, Alkohol-Entzugssyndrom)

Die erfindungsgemäße Verwendung eines Inhibitors des PKI-alpha (hierin im folgenden auch als PKI-alpha-I bezeichnet) beruht wiederum auf der überraschenden Erkenntnis, daß PKI-alpha eine konzentrationsabhängige, inotrope Wirkung besitzt und an der beta-adrenergen Signaltransduktion beteiligt ist. Im Lichte dieser Eigenschaften von PKI-alpha kann ein Inhibitor von PKI-alpha zu einer Modifizierung und Umkehr der Wirkungen von PKI-alpha führen. Infolge dessen kann ein Inhibitor von PKI-alpha zur Blutdruckerhöhung bzw. eines hierfür geeigneten Medikamentes verwendet werden. Nachdem der Inhibitor von PKI-alpha auf einen Inhibitor der beta-

- adrenergen Signalübertragung einwirkt, agiert er selbst als beta-Agonist und kann entsprechend verwendet werden. Diese Verwendung umfaßt allgemein die Verwendung zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und Prävention von Krankheiten, bei denen beta-Agonisten verwendet werden können: Somit kann ein Inhibitor von PKI-alpha in Ergänzung zu dem bzw. den bisher verwendeten beta-Agonisten in Medikamenten verwendet werden. Grundsätzlich bestehen dabei keinerlei Einschränkungen, so daß mit dem Inhibitor von PKI-alpha nun ein Ersatz für ein jegliches, einen beta-Agonisten als pharmazeutischen Wirkstoff enthaltendes Medikament bereitgestellt wird.
- 10 Dem Begriff des Inhibitors von PKI-alpha liegt dabei wiederum eine funktionelle Definition zugrunde. Ein Inhibitor von PKI-alpha ist somit eine jegliche Verbindung, die die Wirkung von PKI-alpha inhibiert, wobei unerheblich ist, in welchem Maße die Inhibierung des PKI-alpha erfolgt, welcher chemischen Verbindungsclassse der Inhibitor des PKI-alpha zugeordnet werden kann und auf der Grundlage welches Mechanismus der Inhibitor von PKI-alpha seine Wirkung entfaltet.

Ein Mechanismus, der der Wirkung eines Inhibitors von PKI-alpha zugrunde liegen kann, ist die Inhibierung der Transkription von PKI-alpha. Als Inhibitor in diesem Sinne wirkt bspw. das Genprodukt des zweiten offenen Leserahmens des PKI-alpha-Gens. Daß dabei das Genprodukt das aktive Agens sein kann, scheint sich aus Wang X. et al.; Mol Pharm 54, 514-524 (1998) zu ergeben. Die Aminosäuresequenz dieses Genproduktes vom Menschen lautet

Met Trp Ile Phe Gly Ser Asn Asp

- 25 und ist als SEQ ID No. 3 zusammen mit der sie codierenden Nukleinsäuresequenz hierin aufgenommen.

Die korrespondierende Sequenz vom Schwein lautet

Met Trp Ile Phe Val Ser Asn Asp

und ist als SEQ ID No. 4 zusammen mit der sie codierenden Nukleinsäuresequenz hierin aufgenommen.

Der zwischen den beiden Arten Mensch und Schwein bestehende
5 Unterschied in Form eines Aminosäureaustausches an der Position 5 der
Aminosäuresequenz beruht auf einem Austausch auf Ebene der
Nukleinsäure, wobei Position 2 des fünften Codons geändert ist. Im Falle der
Sequenz beim Menschen findet sich Glycin als fünfte Aminosäure,
wohingegen diese im Falle der Sequenz vom Schwein Valin ist. Der hierzu
10 korrespondierende Basenaustausch ist eine Änderung von G (human) zu T
(Schwein).

Für den Fachmann ist offensichtlich, daß Abweichungen von den in SEQ ID
No. 3 und SEQ ID No. 4 offenbarten Sequenzen möglich sind, so lange das
von den Sequenzen abgeleitete Derivat nach wie vor eine für PKI-alpha,
15 insbesondere dessen Transkription, inhibitorische Wirkung aufweist.

Beta-Agonisten und damit Inhibitoren von PKI-alpha, wie hierin offenbart,
können verwendet werden zur bzw. bei

1. Erhöhung der Kontraktilität des Myokards (wünschenswert bei schwerer
Herzinsuffizienz oder bei Herzinfarktpatienten (chronische
20 Herzinsuffizienz und akute Herzinsuffizienz)

2. Hypotonie

Es ist für den Fachmann offensichtlich, daß die erfindungsgemäßen
Verwendungen im Rahmen von therapeutischen und präventiven

Behandlungen eingesetzt werden können, insbesondere an Personen, die einer solchen Behandlung bedürfen.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um Verfahren, mittels derer Verbindungen ermittelt bzw. bereitgestellt werden, die als PKI-alpha, d.h. als Inhibitoren der Proteinkinase A bzw. als Inhibitoren derselben verwendet werden können, insbesondere im Zusammenhang mit einem oder mehreren der hierin offenbarten Krankheiten oder Indikationsfelder. Dabei können die Verfahren auch darauf gerichtet sein, daß ausgehend von einer Vielzahl von Verbindungen eine oder mehrere daraus mit einer entsprechenden Eigenschaft ermittelt werden soll(en) („Screenen“). Eine Verbindung, die möglicherweise eine entsprechende Eigenschaft aufweist, wird hierin auch als „Kandidaten“- Verbindung bezeichnet.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung bzw. zum Screenen einer im weitesten Sinne beta-antagonistisch wirkenden Verbindung kann der bereitgestellte Rezeptor als isoliertes Molekül, bspw. in Lösung oder immobilisiert, vorliegen. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß der Rezeptor in einem biologischen System vorliegt. Ein derartiges biologisches kann ein in vitro System oder ein in vivo System sein. Ein typisches in vitro System ist dabei ein Translations- oder Transkriptionssystem. Ein typisches in vivo System ist dabei ein zelluläres System, bspw. eine Zelle, insbesondere eine Myokard- oder Nervenzelle, die die genetische Information für PKI-alpha enthält. Ein zelluläres System kann aber auch eine Zelle sein, in die, bevorzugterweise mittels gentechnologischer Methoden, eine für PKI-alpha oder einen Teil davon codierende Nukleinsäure oder dessen bzw. deren Expression steuernde Nukleinsäure eingeführt ist. Bei der Verwendung der in vivo und in vitro Systeme kann dabei von der hierin ebenfalls offenbarten Stressinduzierbarkeit des PKI-alpha Gebrauch gemacht werden.

- Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann weiterhin vorgesehen sein, daß die Wirksamkeit eines Kandidaten-Antagonisten bewertet wird auf der Grundlage eines Vergleiches der Wirkung von PKI-alpha und seinen Derivaten, wie sie hierin beschrieben sind. Dadurch kann bereits zu einem
- 5 sehr frühen Zeitpunkt des Screenens bzw. des Entwicklungsprozesses neuartiger beta-Antagonisten und beta-Agonisten eine Quantifizierung der Wirksamkeit der getesteten Verbindungen erfolgen. Dabei kann das erfindungsgemäße Verfahren auch vorsehen, daß ein beta-Agonist, wie er hierin beschrieben ist, verwendet wird.
- 10 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Bestimmung bzw. zum Screenen einer im weitesten Sinne beta-agonistisch wirkenden Verbindung kann der bereitgestellte beta-Agonist als isoliertes Molekül, bspw. in Lösung oder immobilisiert, vorliegen. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß der Kandidaten-Agonist in einem biologischen System vorliegt.
- 15 Ein derartiges biologisches System kann ein in vitro System oder ein in vivo System sein. Ein typisches in vitro System ist dabei typischerweise ein zellfreies Translations- oder Transkriptionssystem. Ein typisches in vivo System ist dabei ein zelluläres System, bspw. eine Zelle, insbesondere eine Myokard- oder Nervenzelle, die die genetische Information für den
- 20 Kandidaten-beta-Agonisten enthält. Ein zelluläres System kann aber auch eine Zelle sein, in die, bevorzugterweise mittels gentechnologischer Methoden, die für den Kandidaten-beta-Agonisten oder einen Teil davon codierende Nukleinsäure oder dessen bzw. deren Expression steuernde Nukleinsäure eingeführt ist.
- 25 Das im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Transkriptionssystem für einen beta-Antagonisten kann dabei ein in vivo System oder ein in vitro System sein. Ein typisches in vitro System ist dabei ein Translations- oder Transkriptionssystem. Ein typisches in vivo System ist dabei ein zelluläres System, bspw. eine Zelle, insbesondere eine Myokard-
- 30 oder Nervenzelle, die die genetische Information für PKI-alpha enthält. Ein

zelluläres System kann aber auch eine Zelle sein, in die, bevorzugterweise mittels gentechnologischer Methoden, die für PKI-alpha oder einen Teil davon codierende Nukleinsäure oder dessen bzw. deren Expression steuernde Nukleinsäure eingeführt ist. Bei der Verwendung der in vivo und in vitro
5 Systeme kann dabei von der hierin ebenfalls offenbarten Stressinduzierbarkeit des PKI-alpha Gebrauch gemacht werden.

Es ist auch im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren, daß das Transkriptionssystem für einen beta-Antagonisten auch den Kandidaten-beta-Agonisten bzw. die für ihn codierende oder dessen Expression steuernde
10 Nukleinsäure umfaßt. Des weiteren ist es im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren, daß beta-Antagonisten und beta-Agonisten, wie sie hierin offenbart und beschrieben sind bzw. nach einem der hierin offenbarten Verfahren ermittelt oder als solche bestimmt werden können, darin verwendet werden.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann weiterhin vorgesehen sein, daß
15 die Wirksamkeit eines Kandidaten-beta-Agonisten bewertet wird auf der Grundlage eines Vergleiches der unter dem Einfluß des Kandidaten-beta-Agonisten beobachteten Änderung der Transkription des beta-Antagonisten mit der unter dem Einfluß eines beta-Agonisten, wie er hierin beschrieben ist, beobachteten Änderung der Transkription des beta-Antagonisten. Dadurch
20 kann bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Screenens bzw. des Entwicklungsprozesses neuartiger beta-Agonisten eine Quantifizierung der Wirksamkeit der getesteten Verbindungen erfolgen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Figuren, Beispiele und das Sequenzprotokoll weiter veranschaulicht werden, woraus sich weitere
25 Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben können. Dabei zeigt:

Fig. 1 die Funktion der Proteinkinase A und des PKI-alpha bei der beta-adrenergen Signaltransduktion: Genauer ist die Signaltransduktionskaskade der β 1- und β 2-Rezeptoren (β 1 und β 2 AR)

gezeigt, die über α -, β - und γ - G-Protein-Untereinheiten sowie die Adenylatcyclase (AC) und cAMP-Erhöhen die Proteinkinase A aktivieren. Die Proteinkinase A kann durch den PKI-alpha inhibiert werden, wodurch die Effekte der Proteinkinase A antagonisiert werden können. Die Proteinkinase A phosphoryliert insbesondere Phospholamban, wodurch die positiv inotrope Wirkung erklärt werden kann.

Fig. 2 die Abnahme der Funktion des linken Herzventrikels nach Verabreichung von PKI-alpha ausgedrückt als dp/dt und externe Herzarbeit (EHW).

BEISPIELE

Beispiel 1: Untersuchungen zur Wirkung von PKI-alpha an einem arbeitenden Rattenherz

Die Herzen von insgesamt sechs Sprague Dawley – Ratten mit einem Gewicht von etwa 300 g wurden isoliert und wie bei Schulze et al. (Schulze et al.; Circulation 1990: 959-69) beschrieben perfundiert. Die hämodynamischen Parameter einschließlich Kontraktilität, externe Herzarbeit (EHW), Koronar- und Aortenfluß, wurden etwa 15 Minuten nach antegrader Perfusion aufgezeichnet. Zellpermeabler, rekombinanter PKI-alpha (Aminosäuren 14 bis 22, Calbiochem # 476485) wurde dann verabreicht. Die Verbindung wurde direkt mittels einer Motorpumpe in die Atriumkanüle infundiert. Die Infusionsgeschwindigkeit wurde dem Auswurfvolumen (der Summe aus Aorta- und Koronarfluß) fortdauernd angepaßt und in fünfminütigen Intervallen erhöht, um die letztendlichen PKI-alpha-Konzentrationen im Perfusat von 0,5 , 1,0 und 2,0 $\mu\text{mol/l}$ zu erreichen. Die Ergebnisse betreffend das externe Herzvolumen und den Verlauf von dp/dt_{max} unter diesen Versuchsbedingungen sind in Fig. 2 dargestellt.

Die Infusion des verkürzten PKI-alpha verursachte eine ausgeprägte, reversible, konzentrationsabhängige (bis zu 2 μ Mol) Depression der Myokardfunktion, die vergleichbar war der nach kurzer koronarer Okklusion beobachteten Dysfunktion. Die gemessene Verringerung der externen
5 Herzarbeit und dp/dt-max war im gepaarten T-Test (engl.: „paired t-test“) für alle getesteten Konzentrationen signifikant. Die Perfusion mit dem verkürzten PKI-alpha führte zu einer Verringerung der externen Herzarbeit um 43 % und einer Abnahme der linksventrikulären Funktion, ausgedrückt als dp/dt-max, um 53 %.

10

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich, daß die verkürzte Form des PKI-alpha geeignet ist zur Blutdrucksenkung und allgemein zur Verwendung als eine neue Form bzw. Substanzklasse eines beta-Antagonisten.

15 Beispiel 2: Untersuchungen an Zellkulturen

Auf Zellkulturen von Myozyten (z.B. C9H2-Zellen, zu beziehen von der American Type Culture Collection) wurde der auf die Aminosäuren 14 bis 22 verkürzte Proteinkinase-Inhibitor-alpha gegeben und die Aktivität der
20 Proteinkinase A bestimmt. Es wurde eine dosisabhängige Abnahme der Aktivität festgestellt.

Auf Zellkulturen von Myozyten wurde der 9 Aminosäuren lange PKI-alpha-Inhibitor (das Genprodukt des zweiten offenen Leserahmens der PKI-Gens
25 beim Menschen und beim Schwein) gegeben und die Expression des PKI-alpha sowie die Aktivität der Proteinkinase A bestimmt. Es wurde eine von der Dosis des PKI-alpha-Inhibitors abhängige Zunahme der Aktivität der PKA festgestellt.

30 Zellkulturen von Myozyten wurden mit einem Expressionsplasmid mit der Sequenz von PKI-alpha, wie bspw. beschrieben bei Olsen (Olsen et al.; Endocrinology 5; 1246 – 1256 (1991)) transfiziert und die Expression des PKI-

alpha bestimmt. Gleichzeitig wurde die Aktivität der Proteinkinase A, die spezifisch durch PKI-alpha inhibiert wird, bestimmt. (Proteinkinase A ist sowohl in quergestreiften als auch glatten Muskelzellen enthalten (Wang X. et al.; Mol Pharm 54, 514-524 (1998))). Auf diese Zellkulturen wurden
5 verschiedene Konzentrationen des Proteinkinase-Inhibitor -alpha-Inhibitors (PKI-alpha-I) gegeben. Die Expression des PKI-alpha wurde in Abhängigkeit von der Konzentration des PKI-alpha-Inhibitors verringert.

Die Offenbarung der verschiedenen hierin zitierten Literaturstellen wird hiermit
10 durch Bezugnahme vollständig aufgenommen.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und der Zeichnung offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren
15 verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivaten zur Blutdrucksenkung.
2. Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivaten als beta-Antagonist.
3. Verwendung von PKI-alpha und/oder dessen Derivate zur Herstellung eines Medikamentes für die Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, bei denen ein beta-Antagonist verwendet werden kann.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß PKI-alpha eine in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz umfaßt.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha codiert wird von einer Nukleinsäure, die der codierenden Sequenz der in SEQ ID No. 1 dargestellten Sequenz oder einer sich daraus infolge der Degeneriertheit des genetischen Codes ergebenden oder einer daran hybridisierenden Nukleinsäure entspricht.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha in einer verkürzten Form verwendet wird.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha die Aminosäuren 14 bis 22 der PKI-alpha-Sequenz, insbesondere der Sequenz von PKI-alpha nach SEQ ID No.1 oder SEQ ID No. 2 umfaßt.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha zur Behandlung und/oder

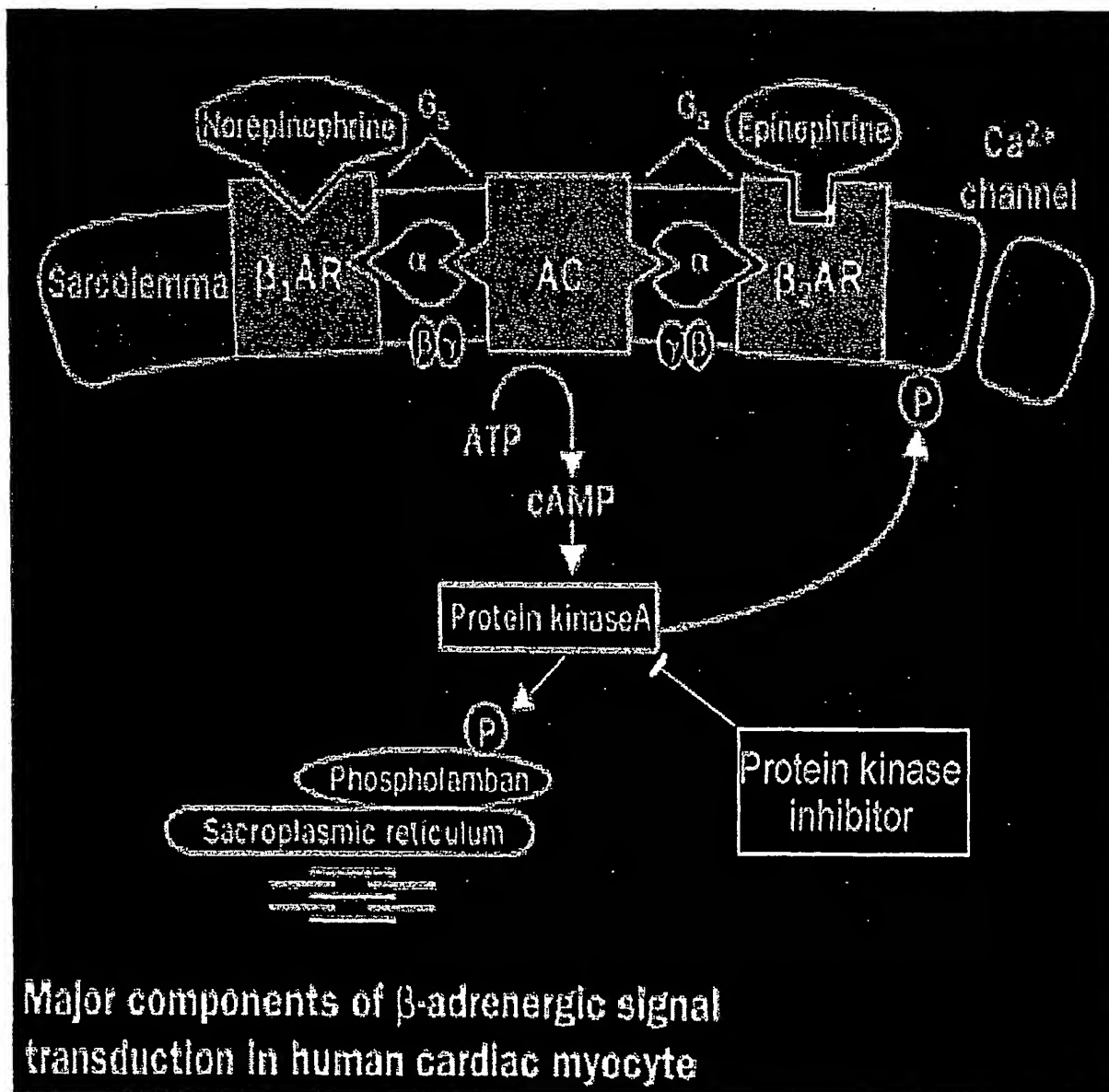
- Prävention von Krankheiten verwendet, wird, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Herzrhythmusstörungen, hyperkinetisches Herzsyndrom, Angina pectoris, Myokardinfarkt, akuter Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonus, essentielle und renale
5 Hypertonie, Pfortaderhochdruck, Blutungen aus Oesophagusvarizen, Phäochromozytom, Überdosierung von beta-Sympathomimetika und Cholinrezeptoren-Blockern, Glaucoma simplex, Hyperthyreose, Thyreotoxikose, Migräne, essentieller Tremor, Erregungstremor und Alkohol-Entzugssyndrom umfaßt.
- 10 9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha zur Postinfarkt-Medikation, Prophylaxe der Reinfarktes und/oder als Beruhigungsmittel verwendet wird.
- 15 10. Verwendung eines Inhibitors von PKI-alpha oder eines Derivates davon zur Blutdruckerhöhung.
11. Verwendung eines Inhibitors des PKI-alpha oder eines Derivates davon als beta-Agonist.
- 20 12. Verwendung eines Inhibitors des PKI-alpha oder eines Derivates davon zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Agonist verwendet werden kann.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Inhibitor die Transkription des PKI-alpha beeinflußt.
- 25 14. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der PKI-alpha ein PKI-alpha nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ist.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Inhibitor des PKI-alpha eine Aminosäuresequenz umfaßt, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die Sequenzen mit der SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4 umfaßt.
- 5 16. Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Inhibitor des PKI-alpha zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten verwendet wird, die ausgewählt sind aus der Gruppe, die Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, chronische und akute Herzinsuffizienz und Hypotonie umfaßt.
- 10 17. Verfahren zum Screenen auf Mittel zur Blutdrucksenkung, beta-Antagonisten und/oder Mitteln zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen ein beta-Antagonist verwendet werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß
- 15 - eine Mischung aus einem beta-Rezeptor, einem beta-Agonisten des beta-Rezeptors und einem Kandidaten-beta-Antagonisten bereitgestellt wird, und
- bestimmt wird, inwieweit sich durch den Kandidaten-beta-Antagonisten das Bindungsverhalten des beta-Agonisten an den beta-Rezeptor ändert.
- 20 18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die unter dem Einfluß des Kandidaten-beta-Antagonisten beobachtete Änderung des Bindungsverhaltens des beta-Agonisten an den beta-Rezeptor verglichen wird mit der unter dem Einfluß des beta-Antagonisten nach einem der Ansprüche 1 bis 9 beobachteten Änderung des
- 25 Bindungsverhaltens des beta-Agonisten an den beta-Rezeptor.
19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß der beta-Rezeptor ausgewählt ist aus der Gruppe, die beta1- und beta2-Rezeptoren umfaßt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der beta-Agonist ein Sympathomimetikum ist, insbesondere ein solches, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Dobutamin umfaßt.
- 5 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß der beta-Agonist ein beta-Agonist nach einem der Ansprüche 10 bis 16 ist.
22. Verfahren zum Screenen auf Mittel zur Blutdrucksenkung, beta-Agonisten und/oder Mittel zur Behandlung und/oder Prävention von
- 10 Krankheiten, bei denen ein beta-Agonist verwendet werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß
- ein Transkriptionssystem für einen beta-Antagonisten bereitgestellt wird,
 - ein Kandidaten-beta-Agonist dem Transkriptionssystem
 - 15 zugesetzt wird und
 - bestimmt wird, inwieweit sich durch den beta-Agonisten die Transkription für den beta-Antagonisten ändert.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die unter dem Einfluß des Kandidaten-beta-Agonisten beobachtete Änderung der
- 20 Transkription des beta-Antagonisten verglichen wird mit der unter dem Einfluß des beta-Agonisten nach einem der Ansprüche 11 bis 16 beobachteten Änderung der Transkription des beta-Antagonisten.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß der beta-Antagonist ein solcher nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß der beta-Antagonist erhältlich ist nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 21.

Fig. 1



2/2

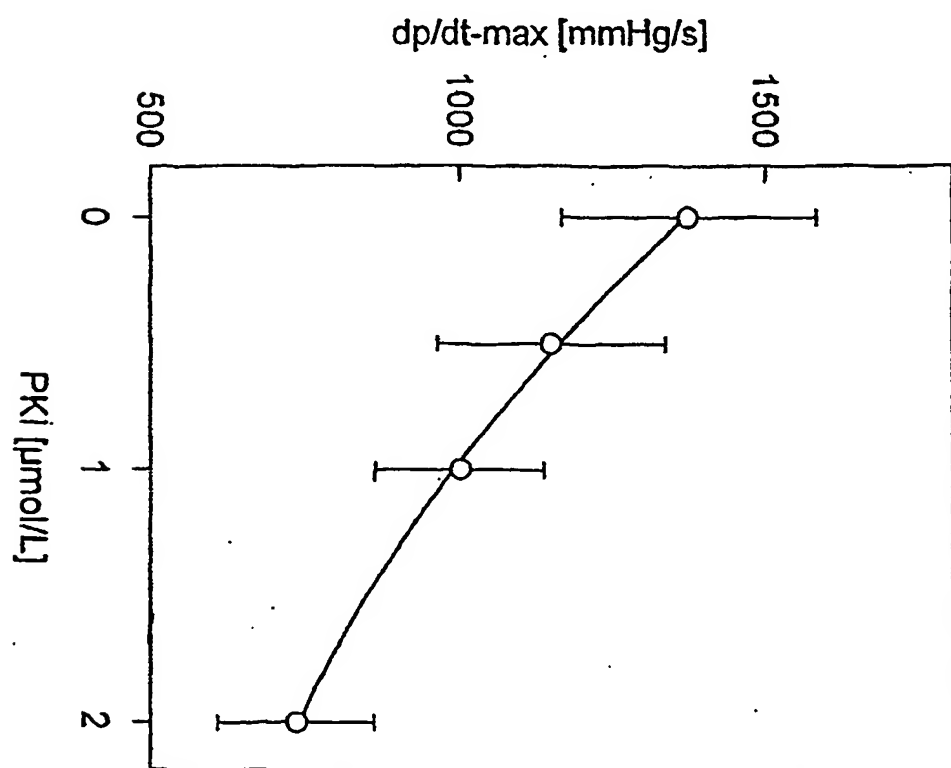
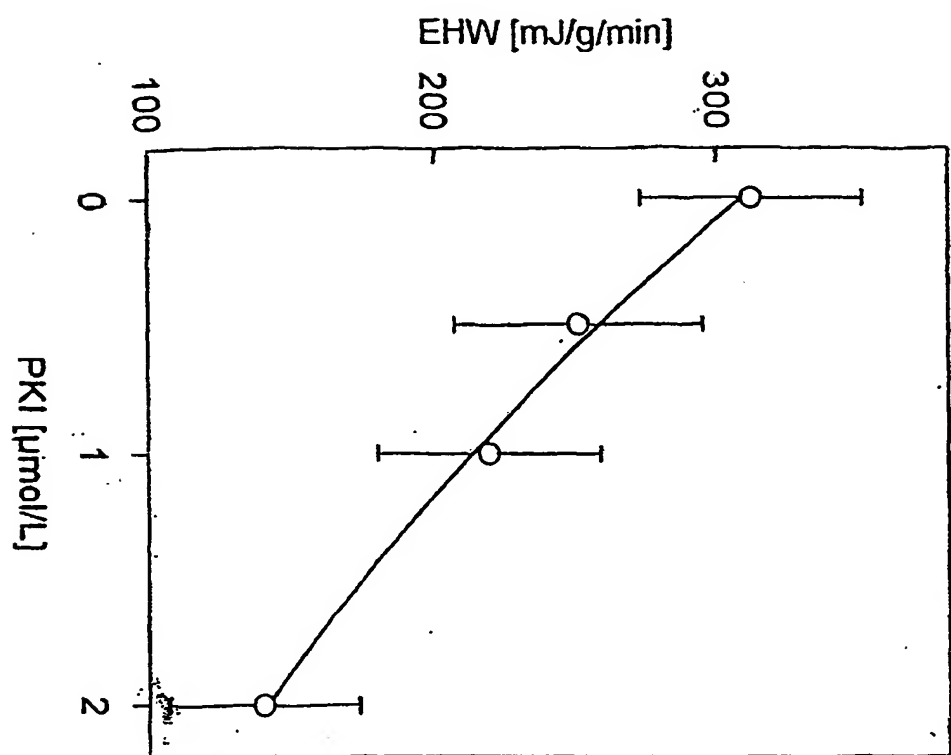


Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schering AG

5 <120> Sequenzen von PKI-alpha

<130> S30020-PKIa

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 3702

<212> DNA

<213> Sus scrofa

20

<220>

<221> CDS

<222> (49)..(279)

25 <223> wird durch Stress induziert; Produkt ist der
Protein-Kinase-Inhibitor-alpha

<400> 1

gacaagaagg	tttccaatca	gtccctgcta	tgtggatatt	tgtagca	atg act gat	57
					Met Thr Asp	
					1	

30

gtg gaa act aca tat gca gat ttt att gct tca gga aga aca ggt aga	105
Val Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Ala Ser Gly Arg Thr Gly Arg	
5 10 15	

35

aga aat gca ata cat gat atc ctg gtt tcc tct gca agt ggc aac agc	153
Arg Asn Ala Ile His Asp Ile Leu Val Ser Ser Ala Ser Gly Asn Ser	
20 25 30 35	

40

aat gaa tta gcc ttg aaa tta gca ggt ctt gat atc aac aag aca gaa	201
Asn Glu Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp Ile Asn Lys Thr Glu	
40 45 50	

45

ggt gaa gag gat gca cag cga agt tcg aca gaa caa agt ggg gaa gcc	249
Gly Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Ser Thr Glu Gln Ser Gly Glu Ala	
55 60 65	

50

cag gga gaa gca gca aaa tca gaa agc taa cactccactt tgatctttat	299
Gln Gly Glu Ala Ala Lys Ser Glu Ser	
70 75	

55

caacacctga caatgtctca aatctccggg cctgtctgga atgcatttat ttccgagagt	359
-------------------------------------------------------------------	-----

60

gaaaggggga aaaagaaaat ggctgttctg cattgccgga aactgcttgt tatgttaaaa	419
-------------------------------------------------------------------	-----

atgggggcag aggctgtggc tgcagacaga cttttctcta cctctggcat tagcaatggt	479
-------------------------------------------------------------------	-----

tgaaaatcat gtggcttggg tttggatgtc atttttggga tggatccttt cacttgacca	539
-------------------------------------------------------------------	-----

60

tatatatgac gaaatgcttg tagagagtag ccgcactgac ctagatgatg attcttcctg	599
-------------------------------------------------------------------	-----

tagcatctgg ccctcacaa tgtcagagga ttttaattgtg tctaatacgca aagggttggt	659
--------------------------------------------------------------------	-----

tgaaccccag agtttttaaat atctctggcc caagtattca cccagtaaaa gaaccatcca 719
 gaaagcactg tttttaacat tatgtatctg tgtgttcctg ctgtgttatt tacactgttt 779
 5 tgtattgtac aatatagatg ctccagcactg ccccttctt tgattgctta tgaaaaacaa 839
 aaatgatgtc ttgttactgt gaatttttat accactcatt tttaaaaggg ctgccttttt 899
 10 ttctgtcca tagtgtggtg gtgtacacag gataágatag aacacacttt tttttttttt 959
 aaacataatc tttccctta attcactgct gatgaattaa gtctaacaga ttcataaga
 1019
 15 ctctttttgc ttattgtaca ggcattcgaa aatattccatt aatgtgaata ttacctgaat
 1079
 tcagtctgtt tgggtgtctgc acagaccaga attcaatctg caaattttgt cttttgcca
 1139
 20 agtgtaaaac tttttccaat gaatattttt attttcagtt atgaggattt gggagaattg
 1199
 gggagggtgg aaagagaatc caaggtaata ccaagcactg gaaatacttc ctttctatga
 1259
 25 aatcaaattt ctccagctgc tgtatgatat tattaaaatt tggaggacaa cttatctcca
 1319
 30 cagagctgca aaagatggag aaaatgacct tgcaatcatg tggacaccaa tcacaaaaat
 1379
 aaagcccttg tgtttttcat gtcttttttc agccccatca gatccaatg ttattatgca
 1439
 35 gtttttaatg tttgtaaact tttactaata taattagtgt gaattgcatt ctgatacaat
 1499
 aataatcatt attagaagct gacaaaaatc cttattaata ctgttgatgg cctctgctgt
 1559
 40 gttttgacat catggttctt atatggaaag tttcctgtgt aatccctcca gtcagtatta
 1619
 tgaaatcatt tctcagtagt aataaaaaag gcaaccagtaa tatgcagtgg ctcatgaatt
 1679
 45 actggataaa tacaaggcaa caggaagacc ctttacaata aaaagccac ttaactatcc
 1739
 50 tccaggtctt agatagcgtc tcacgtgaag taggttaggc agcatttcag cagataatca
 1799
 gtatggacaa accaggatct cagccctcct ttgtagtac ataagtgatg aaaggtaagt
 1859
 55 ctgccctcat ctccctttac agtacatttt gaatgagata agggcatggg tatcacttaa
 1919
 60 tcctcaatca tgtattacta gaaaaaatgt taactgtgtg actcttgag aaaataggag
 1979
 gaggaagat taaattttag agaacttcct tttgtctaac ccaatagggt ccaaatggc
 2039

cagttaaatt tcagaccaat ccacctatta atagactcac aaatgggaaa agaggttcct
2099

5 gaggctatatt tagacaattt ctggtagtcc atttaggaca tccacttaca catccataca
2159

atcacttttt catatcctca tttattatcc tcatagcttt cttgtgcatc caggtaacat
2219

10 tctcttcatc cttaaattta tagagttcca gactgatttc atgtgattct gtaaagtta
2279

ggactagtgc tgagtatatg tggaggattt atattcctat gtgatataata attattaatg
2339

15 catgtggtat catgcttgct tttgaatata taatagtgc aaattgtgaa gtcatatgga
2399

20 gcttttgaat tattttgacc tcttactgct actttgtctg ctatattcaa acccaaaggt
2459

attaccaggc cagaaaataa aaatcaactc tccaaaacat ccacatccca tgaaagttgc
2519

25 tcagcaaaag ttcaaaataa cttccaaatt cctgtcatat cttttacttt gcaagtcaat
2579

aatatacatg ggattgaatt ttttaaggaga gaaagaaatg catttggttt gattatacac
2639

atataatgcc tattaactga ctttctgcta atcacttcag cacacatatt cttccactta
2699

35 atcctcaaac aattcaatta aagaggtaac attattccat ttcaggaatc aggaaattaa
2759

agctcaataa ggtataactt ttacaagctt aaaaagctaa taaatgatga aataaaattt
2819

40 gaacctgtgt ttatctgtct ccaggagct ttccacggca catgctctaa aattgaagcc
2879

agttacagag catgtatgct tataagagat ggactggatc agcctccata ttttagagaa
2939

45 ggaaagagta attgttgatc tcaaagttac ctagatgagt aatgacgcag atgtgactag
2999

50 cacttttatt taaaaaaaaa aataataaat ttaattaaaa cttatttttt tgtgttatac
3059

tttccccaga agacattttt ctgacatgaa gtctataaac ttagcatggt tcagattttt
3119

55 tacattccat gctactcatt ttgtttaatt aactaggaat gtgataattt cagttttttg
3179

acttacttgc aataagagaa ctttttcaaa tttatcttta atcaattgta agcatcctgt
60 3239

gctgatattg aaatcataaa ttcatagaaa tgttttttaca acagatgaca aatgattttt
3299

aggcaatatc cccagagcta cacactgtaa atacccaaca ctcaagtctt acttacagtg
3359

5 gaaatgtact gttttagaag atgaacaata ttgcttcaga gaggcaataa ggggttaaaa
3419

aaaaaaaaatg taactgtggg ctgtaaagtt tcttgggtgaa gccagtagtc atggggagaa
3479

10 tatgtaaagt catcaagtga aaacaggaaa ggaactatgt ttatgatgtc ttaataggcc
3539

ctaaattggt ctttcattta aaaagtggca gtctctgaag tcatttgtga gcttgtatga
15 3599

cttttgtatt tagcaatggt gcatgctcac ataattgata ttaaaagtaa tacatttttc
3659

20 tgaaatgtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
3702

<210> 2
25 <211> 76
<212> PRT
<213> Sus scrofa

<400> 2
30 Met Thr Asp Val Glu Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Ala Ser Gly Arg
1 5 10 15

Thr Gly Arg Arg Asn Ala Ile His Asp Ile Leu Val Ser Ser Ala Ser
20 25 30

35 Gly Asn Ser Asn Glu Leu Ala Leu Lys Leu Ala Gly Leu Asp Ile Asn
35 40 45

Lys Thr Glu Gly Glu Glu Asp Ala Gln Arg Ser Ser Thr Glu Gln Ser
40 50 55 60

Gly Glu Ala Gln Gly Glu Ala Ala Lys Ser Glu Ser
65 70 75

45

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
50 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)
55 <223> Zweiter offener Leserahmen der cDNA des PKI-alpha
vom Menschen

<400> 3
atg tgg ata ttt ggt agc aat gac tga
60 Met Trp Ile Phe Gly Ser Asn Asp
1 5

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Sus scrofa
5
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)
<223> Zweiter offener Leserahmen der cDNA des PKI-alpha
10 vom Schwein

<400> 4
atg tgg ata ttt gtt agc aat gac tga 27
Met Trp Ile Phe Val Ser Asn Asp
15 1 5